

## 動脈硬化症における内膜肥厚の初期変化に関する 電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部病理学第一講座（主任：梶川欽一郎教授）

北 村 徳 治

（昭和57年10月15日受付）

ウサギ総頸動脈を銀板製円筒で被包狭窄し、被包端に形成される線維性内膜肥厚、内皮細胞の変化並びに両者の相互関係を電顕的に観察した。被包後1日で被包端に限局する巣状の内皮剥離が生じ、内皮欠損部には血小板が凝着した。内皮細胞の再生は残存内皮細胞の増殖により速やかに行われ、被包後7日には内皮欠損部は再生内皮により完全に被覆された。内膜の線維性肥厚は再生内皮に被覆される部に一致して形成された。再生内皮細胞の一部が内膜に離脱することもあるが、内膜肥厚は中膜から増殖した平滑筋細胞とそれから産生される細胞間物質で構成されることが観察された。平滑筋細胞の増殖は内皮の被包と共に進行し、再生内皮細胞の透過性が亢進していることから血漿滲入による内膜傷害と内膜の線維性肥厚が密接に関係していることが示唆された。

**Key words** Fibrous intimal thickening, Regenerating endothelium.

動脈硬化症の発生原因は複雑で様々な因子が関与しているが、その基本的病変は内膜における細胞増殖と細胞間物質の沈着による線維性肥厚であると考えられる。内膜の線維性肥厚は実験的に内膜を傷害することによって発生することはよく知られている<sup>1)~6)</sup>。このような内膜肥厚の発生機序について、内皮の透過性亢進による血漿の内膜滲入に対する反応として平滑筋細胞が増殖し線維性肥厚が発生するという見解が一般に支持されている<sup>7)~10)</sup>。

内膜傷害に関して、最近内皮の剥離と内膜肥厚との関係が注目され<sup>1)~5)</sup>、Rossら<sup>11)</sup>は内皮が剥離した内膜に凝着する血小板から細胞増殖因子が放出され、その結果、内膜から平滑筋細胞が内膜へ増殖し線維性肥厚が発生するという仮説を提唱した。しかし、内膜肥厚の発生に対する内皮剥離の意義についてはなお異論があり、内皮剥離が軽度な場合には血小板の凝着があっても内膜の線維性肥厚は発生しないこと<sup>12)</sup>や、内皮の透過性亢進があれば内皮の剥離なしに内膜剥離が起りうること<sup>13)</sup>が報告されている。

教室の勝田<sup>14)</sup>はウサギ総頸動脈を銀板円筒で被包狭窄すると被包端の内膜に線維性肥厚が発生することを報告した。勝田は被包端の内膜水腫について中膜から平滑筋細胞が増殖し線維性肥厚が形成されたことから、内皮の透過性亢進の結果起った血漿の滲入によって内膜が障害され、その修復反応として平滑筋細胞の増殖が引き起されたものと解釈した。しかし、この実験系で内皮の剥離が実際に発生するか否か、又、内皮剥離があるとすれば内皮細胞はどのようにして再生され、さらに内皮の再生と内膜肥厚がどのように関係するかについては明らかにされていない。本研究はこれらの点を解明する目的で計画されたものである。

### 材料及び方法

実験材料としてウサギ（雌、体重1.5~2.0 kg）を用い、塩酸ケタミン麻酔下（100 mg/kg、筋注）に左総頸動脈を周囲組織から剥離し、銀板製円筒（内径1 mm、長さ5 mm）で被包狭窄した。手術後1日、3日、7日、2週、4週に被包端部を切り出し、材料として用いた。

An Electron Microscopic Study on the Early Change of Intimal Thickening in Arteriosclerosis. Tokuji Kitamura, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

透過電顕：組織を2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)に1時間固定後、2%オスミウム酸(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)で4°C、90分、後固定を行った。次いでエタノール系列で脱水、エポン 812 で包埋した。試料はダイヤモンドナイフを用い、LKB ウルトラトーム 8800 型で超薄切片を作製し、酢酸ウラニール、硝酸鉛の二重染色、又はタンニン酸染色<sup>15)</sup>を行った。

酸性ムコ多糖及び糖蛋白の検出にはルテニウムレッド(RR)染色<sup>16)</sup>を用いた。又、内皮細胞のヌクレオシドフォスホリラーゼ活性を次の方法<sup>17)</sup>で検査した。組織を2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)に5~10分間固定後、同緩衝液で2時間洗浄した後、反応液(硝酸鉛 3 mM、リボース 1 リン酸 4 mM、ヒポキサンチン 10 mM、蔗糖 220 mM、トリスマレイン酸緩衝液 pH 7.2)に37°C、30分浸漬した。0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4 で洗浄後、2%オスミウム酸(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)で4°C、90分、後固定を行い上記の方法で電顕切片を作製した。試料は日立 HU-500 型電顕で直接倍率 1,500~30,000 倍で撮影した。

走査電顕：塩酸ケタミン麻酔下に開胸を行い、2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)を左心室より注入し、120 mmHg の圧で10分間灌流固定した。被包端部を切り出し、同固定液に1時間浸漬固定後、2%オスミウム酸(0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)で4°C、90分、後固定を行っ

た。次いでエタノール系列で脱水、酢酸イソアミルに置換後、日立 HCP-1 型臨界点乾燥装置で臨界的乾燥を行った。試料はエイコ-IB-1 型イオン・クリーナーで Au-Pd を用いスパッタコーティングを施し、日立 HFS-2 型電顕で直接倍率 50~10,000 倍で観察した。

内膜透過性：Evans ブルーを生理食塩水に溶かし 0.5% 溶液を作成し、3 ml/kg の割合で術後 3 日、1 週、2 週のウサギの耳静脈に注射した。注射後 4 時間で被包端部を切り出し血管内腔面の着色を観察した。

## 成 績

### I. 正常の総頸動脈

走査電顕所見：内皮細胞は紡錘形でほぼ均一の大きさを呈し、血流の方向に配列している(図 1)。内皮細胞の境界は内腔に膨隆する marginal fold により判別できる。内皮細胞のほぼ中央部に楕円形の核の膨隆があり、核の長軸も血流と平行に整然と並んでいる。内皮細胞表面は平滑で marginal fold 以外の突起物は見られない。内皮細胞の密度は 31~36 個/0.01 mm<sup>2</sup>である。

透過電顕所見：血管内腔は一層の扁平な内皮細胞により被われ、隣接する内皮細胞は互いに入り組んでおり、tight junction 又は intermediate junction で接合している。内皮細胞の核は楕円形で処々に浅い陥凹が見られることがある。核の周辺にはゴルジ装置が位置し、原形質には粗面小胞体、糸粒体、マイクロフィラメント及び微細小管が散在性に認められ、管腔面や基

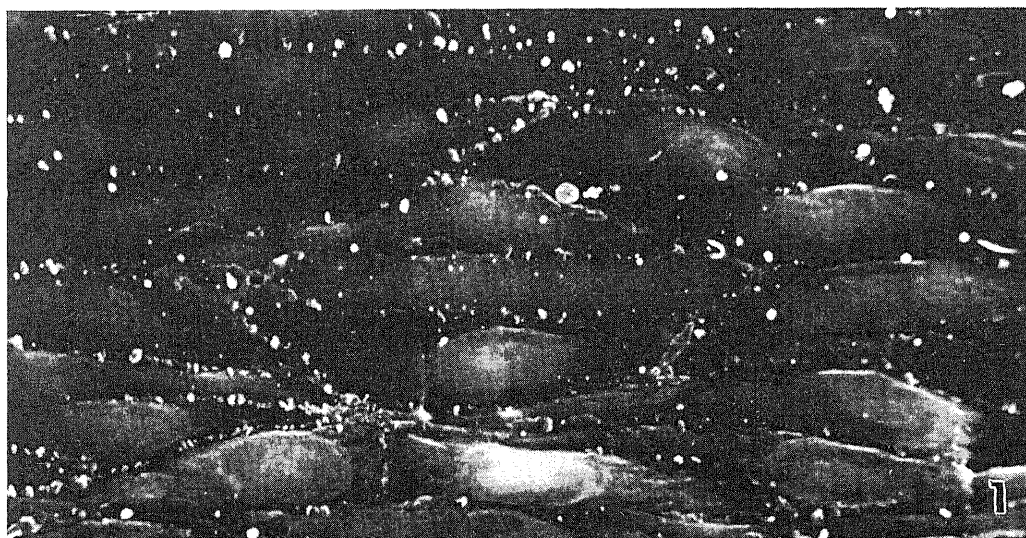


Fig. 1. A scanning electron micrograph of the normal arterial endothelium. The endothelial cells are regularly aligned to the blood stream.  $\times 750$ .

底面に小胞が比較的豊富に存在する。ごくまれに Weibel - Palade 顆粒が認められる。内皮細胞の基底面には幅約 50 nm の基底膜に被われているが、基底膜は処々で断裂している。

内膜と中膜は内弾性板によりへだてられ、内弾性板には処々に有窓が認められる。内膜は RR 陽性の粒子

とフィラメントから成る網状の礎質で満たされ、直径約 10 nm の microfibril、少数の弾力線維及び膠原線維が散在している。内膜の細胞成分は乏しく、少数の平滑筋細胞が見られるのみである。平滑筋細胞周囲には膠原線維や弾力線維が比較的密に集在する。平滑筋細胞は基底膜に被われ、原形質には豊富な筋原線維があ

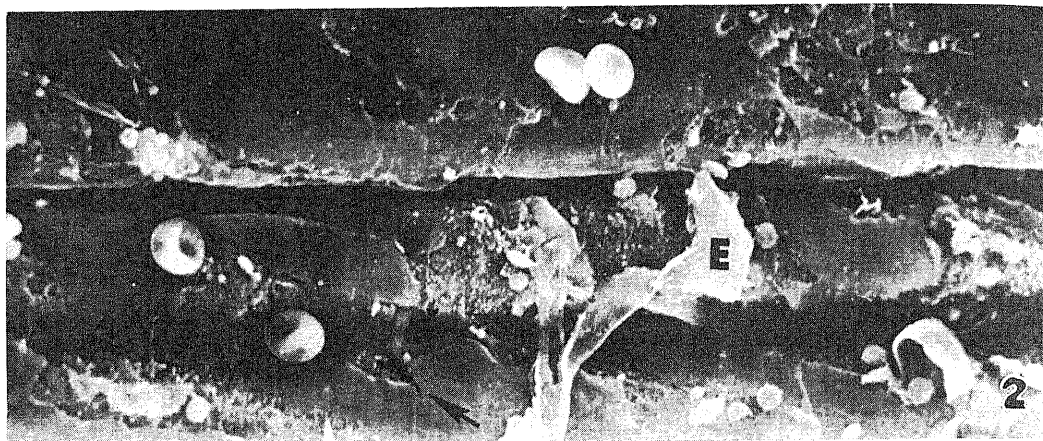


Fig. 2. A scanning electron micrograph of the initial change of the endothelium one day after constriction. Dissociation (arrow) and desquamation of endothelial cells (E) can be seen.  $\times 1,500$ .

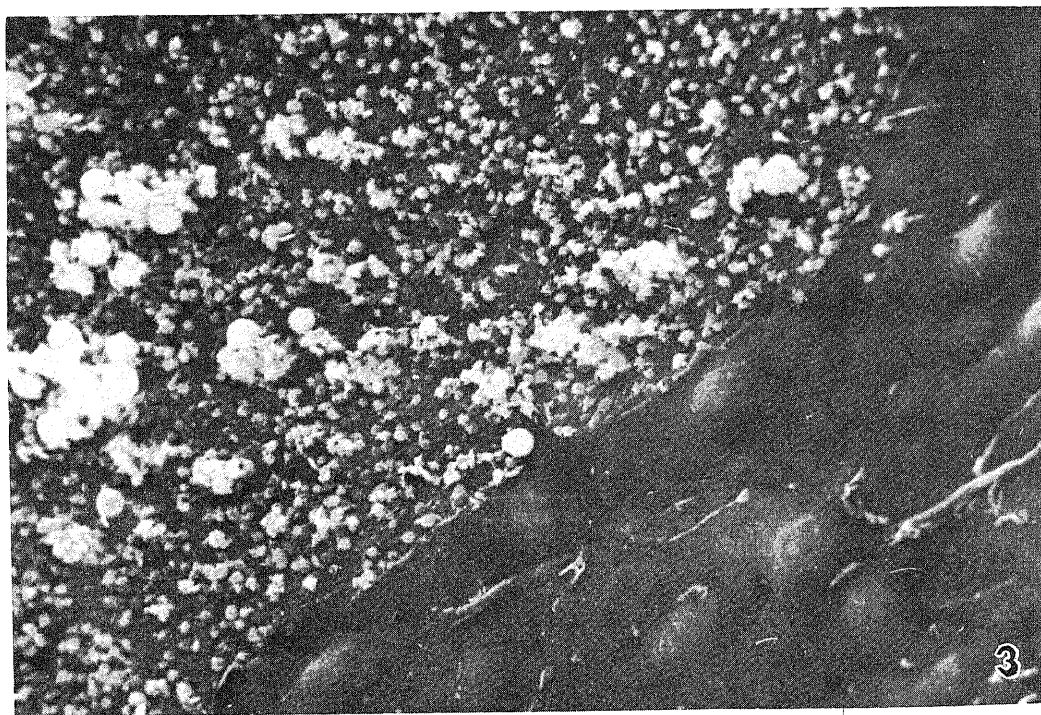


Fig. 3. A scanning electron micrograph showing adhesion of platelets, erythrocytes and leukocytes on the denuded intimal surface. One day after constriction.  $\times 750$ .

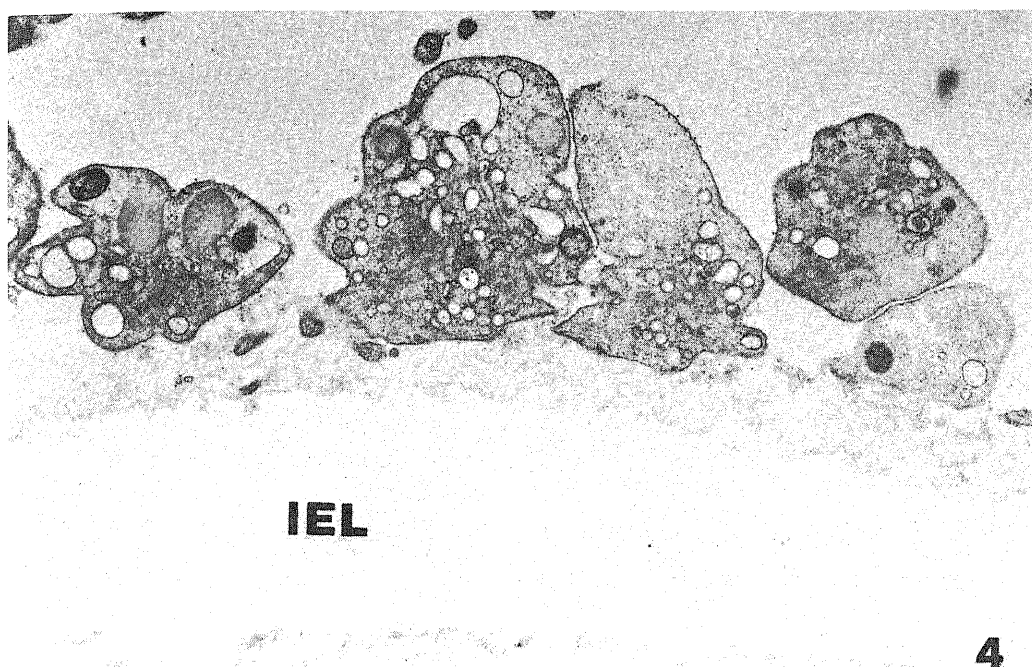


Fig. 4. Adhesion of platelets on the denuded intimal surface. IEL : internal elastic lamina. One day after constriction.  $\times 9,800$ .

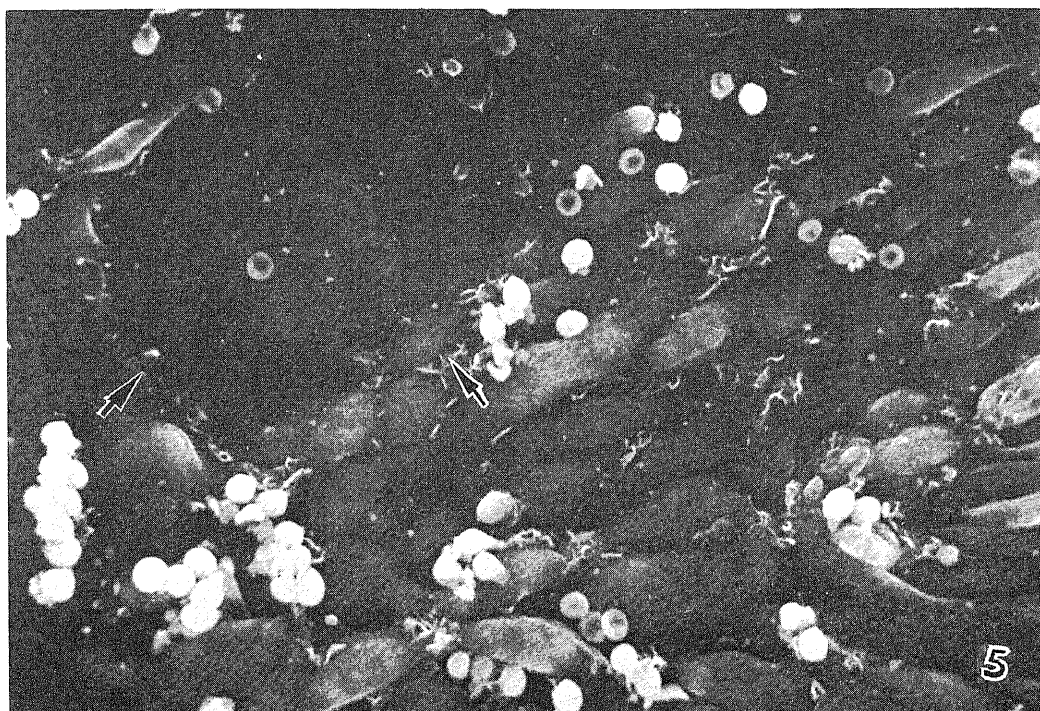


Fig. 5. A scanning electron micrograph of regeneration of the endothelium 3 days after constriction. Regenerating endothelial cells can be seen as polygonal cells with irregular arrangement around the endothelial defect (arrows).  $\times 750$ .



り、細胞内小器管は乏しい。平滑筋細胞は内弾性板の有窓の近くに位置することがあり、有窓を通り中膜と内膜の両方にまたがっている平滑筋細胞も存在する。

中膜では平滑筋細胞と弾力線維が層状に配列し、平滑筋細胞と弾力線維の間は膠原線維と礎質で占められる。

## II. 被包端の変化

### 1. 1日

走査電顕所見：銀板製円筒による被包端部（被包狭窄部に接する非狭窄動脈端で、以下被包端と称する。）に内皮細胞の離開と巣状の剝離が認められた（図2）。剝離は被包端1mmの範囲に局限し、それより離れた処には内皮細胞の剝離は見られなかった。内皮細胞剝離部では、露呈した内膜の表面に白血球、赤血球又は血小板の凝着が認められた（図3）。非剝離部では白血球や赤血球が付着することはあるが、血小板の凝着は認められなかった。

透過電顕所見：被包端の内皮細胞は離開し、変性に陥った内皮細胞は血管内腔へ剝離する像が観察された。露呈した内膜に血小板の凝着が認められる（図4）。内皮細胞剝離部及び剝離周囲の離開した内皮細胞間隙を通して顆粒球、単球が浸潤し血漿の滲入によって起った内膜水腫のため内膜には架状物質の沈着と礎質の網状構造の消失が認められる。

### 2. 3日

走査電顕所見：内皮欠損部の面積は減少し、その周囲に限局性に不規則に配列した多角形の内皮細胞が出現する（図5）。これらの内皮細胞には大小不同が目立ち、処々に2核の大型細胞が認められ、再生内皮細胞と考えられた。内皮欠損部には1日目と同様に血小板、白血球又は赤血球の凝着が認められる。

透過電顕所見：内皮欠損部周囲に出現した再生内皮細胞は立方形を呈する。原形質にはゴルジ装置や粗面小胞体が発達し、基底面にはマイクロフィラメントの集束が見られる。粗面小胞体は拡張し、内腔に架状物質が認められる。基底膜の形成が悪く、しばしば欠如している。またゴルジ装置や粗面小胞体の発達した2核の大型細胞に遭遇する。内弾性板には処々に亀裂が入り、断裂が生じる。内皮欠損部周囲では中膜平滑筋細胞が内弾性板の有窓や断裂部を偽足様突起を出して通り抜け、内膜に侵入する。内膜水腫と増加した平滑筋細胞により内皮欠損部周囲の内膜は軽度に肥厚する。また血漿は内膜から中膜へも滲入し、中膜上層部にも水腫が認められた。

### 3. 1週

走査電顕所見：術後3日以後再生内皮細胞は次第に増加し、1週目には被包端の内皮欠損部は再生内皮細胞により完全に被覆された（図6）。内皮欠損部を被覆

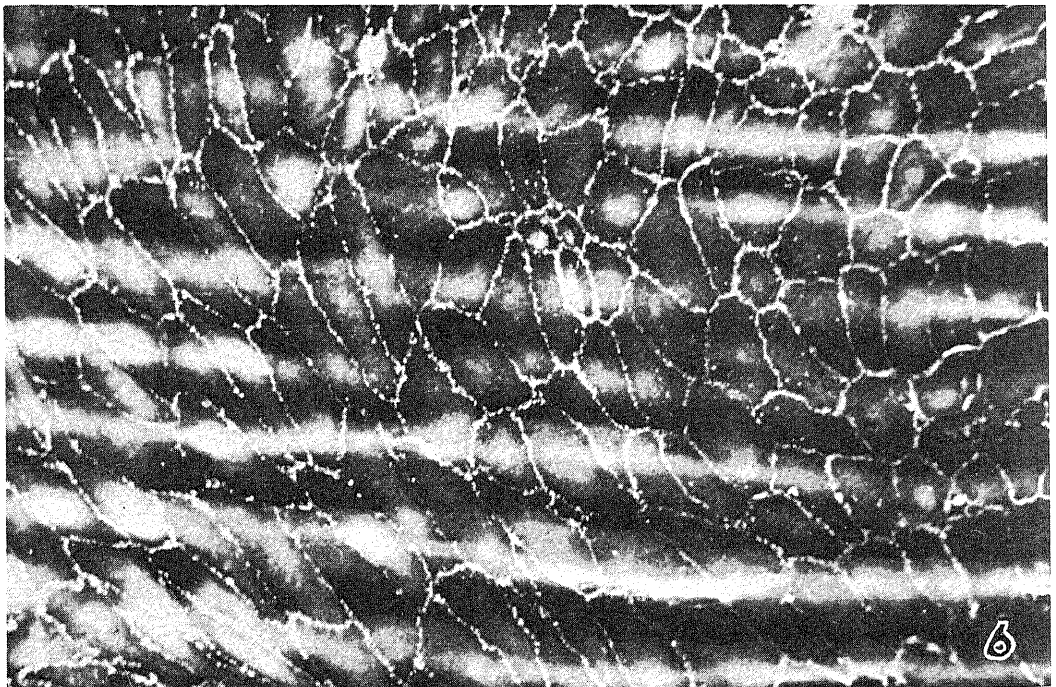


Fig. 6. A scanning electron micrograph showing complete re-endothelialization one week after constriction. Note variety of the regenerated endothelial cells in size and shape.  $\times 750$ .

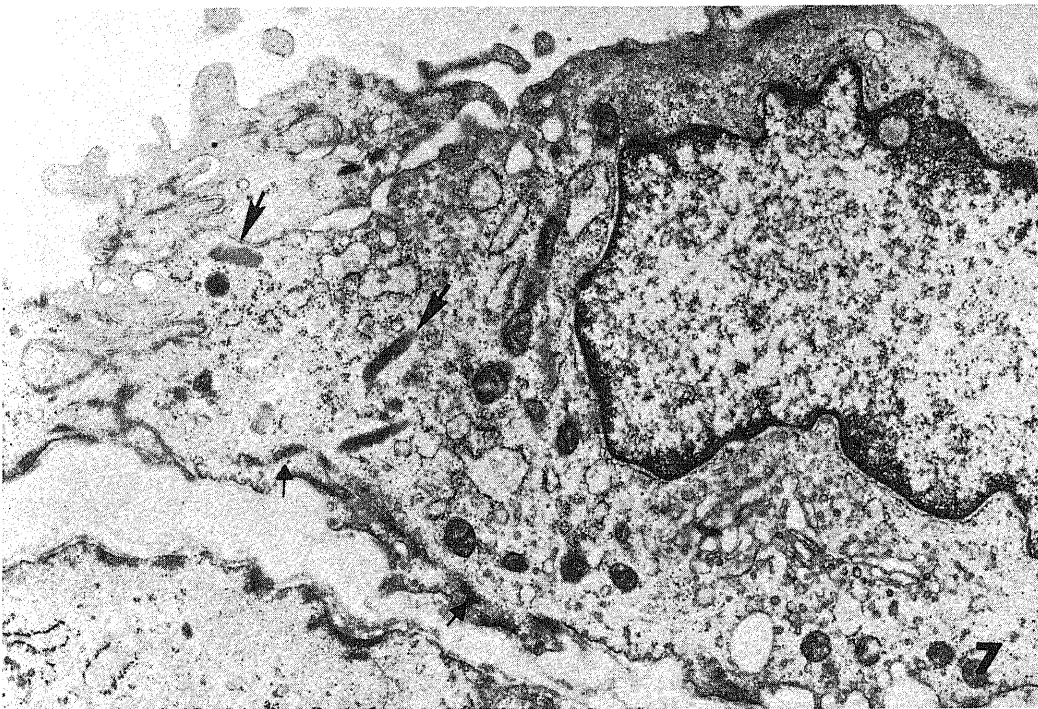


Fig. 7. Regenerated endothelial cells showing increased number of Weibel - Palade granules (large arrows) and intracytoplasmic microfilaments (small arrows). One week after constriction.  $\times 13,000$ .

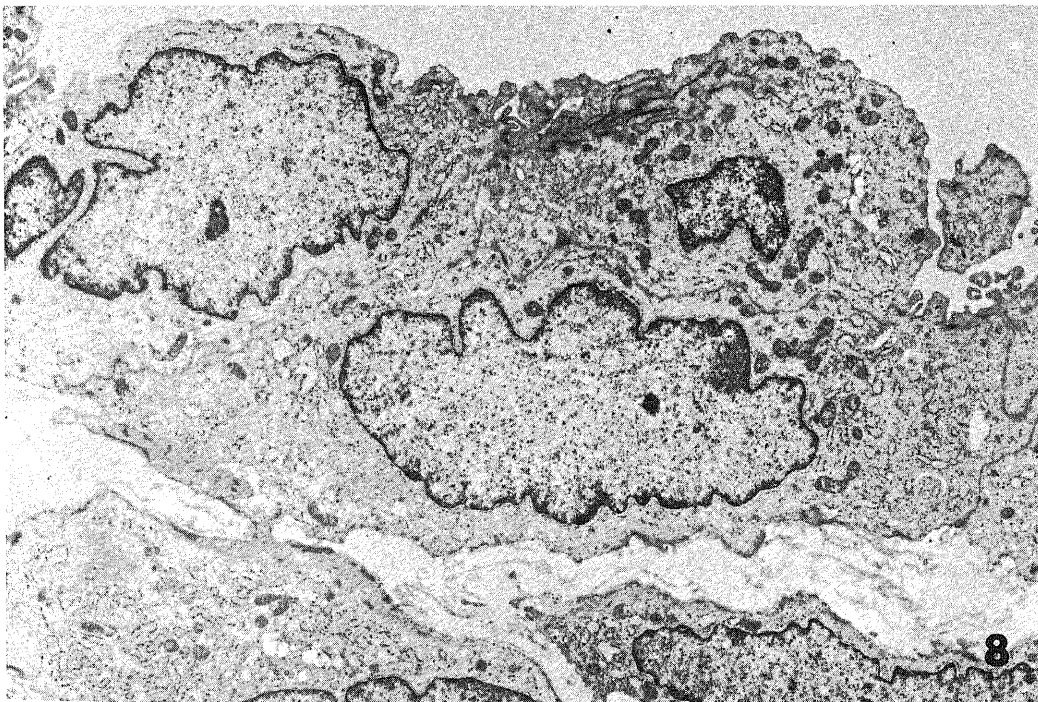


Fig. 8. Regenerated endothelium 1 week after constriction. Endothelial cells are tightly packed with two cell thick.  $\times 5,100$ .

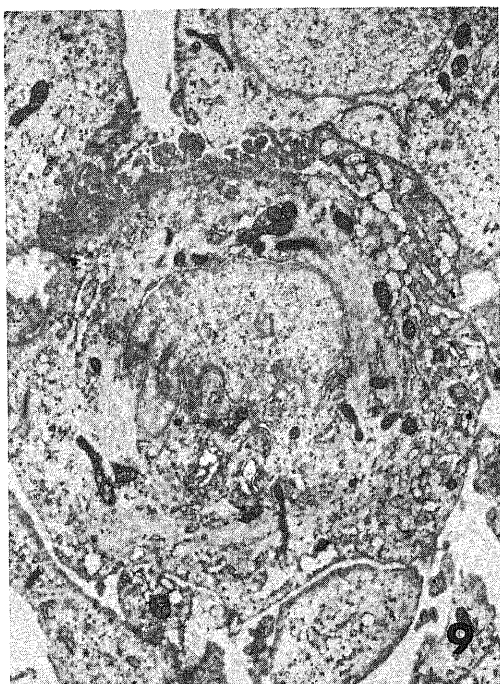


Fig. 9. A endothelial cell situated in the sub-endothelial space, indicating the drop off from the lower layer of the regenerated endothelial cells.  $\times 5,000$ .

した再生内皮細胞には大小不同の marginal fold の膨隆が目立ち、又内皮細胞の密度は平均 66 個/ $0.01 \text{ mm}^2$  で正常に比し著明に増加していた。再生内皮細胞の表面には血小板、白血球又は赤血球の付着は認められない。

透過電顕所見：欠損部を完全に被覆した再生内皮細胞には細胞小器官が発達し、特に Weibel - Palade 顆粒とマイクロフィラメントの増加が目立つ（図 7）。Weibel - Palade 顆粒は原形質辺縁部に比較的多く存在する傾向があり、径 15~20 nm の細管を入れた直径約 0.2~0.3  $\mu$  の桿状構造として同定される。マイクロフィラメントは管腔側及び基底側の原形質辺縁に集束し、処々に dense body が伴われる。再生内皮細胞は密に配列し、処々 2 層に重なった内皮細胞が認められる（図 8）。時々下層の細胞が内膜に落ち込む像が観察される（図 9）。ヌクレオシドフォスフォリラーゼ活性は内皮細胞の原形質液に証明されるが、内皮細胞直下の内膜にも同活性陽性の紡錘形の細胞が認められる（図 10）。

内膜に血液細胞の浸潤はほとんど認められなくなり、平滑筋細胞が増加する。平滑筋細胞はしばしばゴルジ

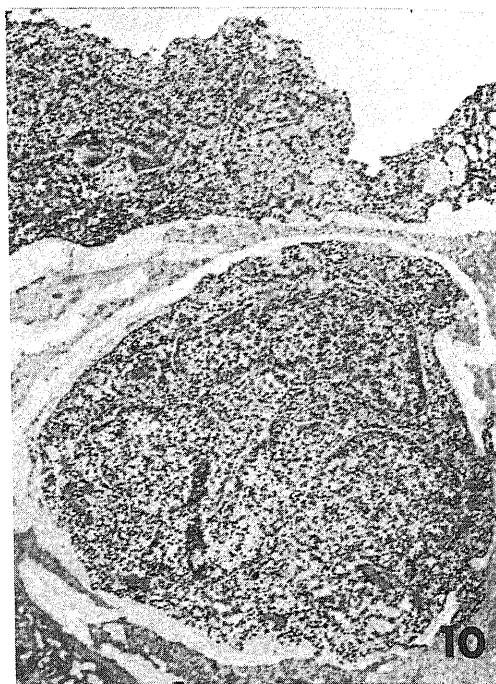


Fig. 10. Nucleoside phosphorylase reaction in the fibrous plaque. The enzyme activity is demonstrated in the endothelial cells as well as in a intimal cells showing that the intimal cell derives from the endothelial cell.  $\times 5,000$ .

装置と粗面小胞体の発育が良好となり、いわゆる modified smooth muscle cell の形態を呈する。Modified smooth muscle cell の増殖は再生内皮細胞で被覆された内膜に強く認められる。これらの modified smooth muscle cell には時々核分裂がみられた。平滑筋細胞及び modified smooth muscle cell にはヌクレオシドフォスフォリラーゼ活性は証明されなかった。内膜における血漿滲入は減少するが、内膜内皮細胞直下の内膜には依然として内膜水腫が観察される（図 11）。

RR 染色標本では内膜水腫の消退にともなって直径 20~50 nm の RR 陽性の粒子と直径 5~15 nm のフィラメントよりなる礎質の網状構造が再び出現し、その中に少数の膠原線維や弾力線維が散在している。

#### 4. 2 週~4 週

走査電顕所見：2 週以後、再生内皮細胞の密度は減少する。4 週目には被包端に不規則な配列を示す再生内皮細胞が認められたが、細胞の大きさはほぼ一様となり、細胞の密度も正常の状態に回復した。内皮が完全に欠損部を被覆した後は、4 週目まで、被包端及びそれ以外の所にも内皮細胞の剝離や血小板の凝着は見られなかった。



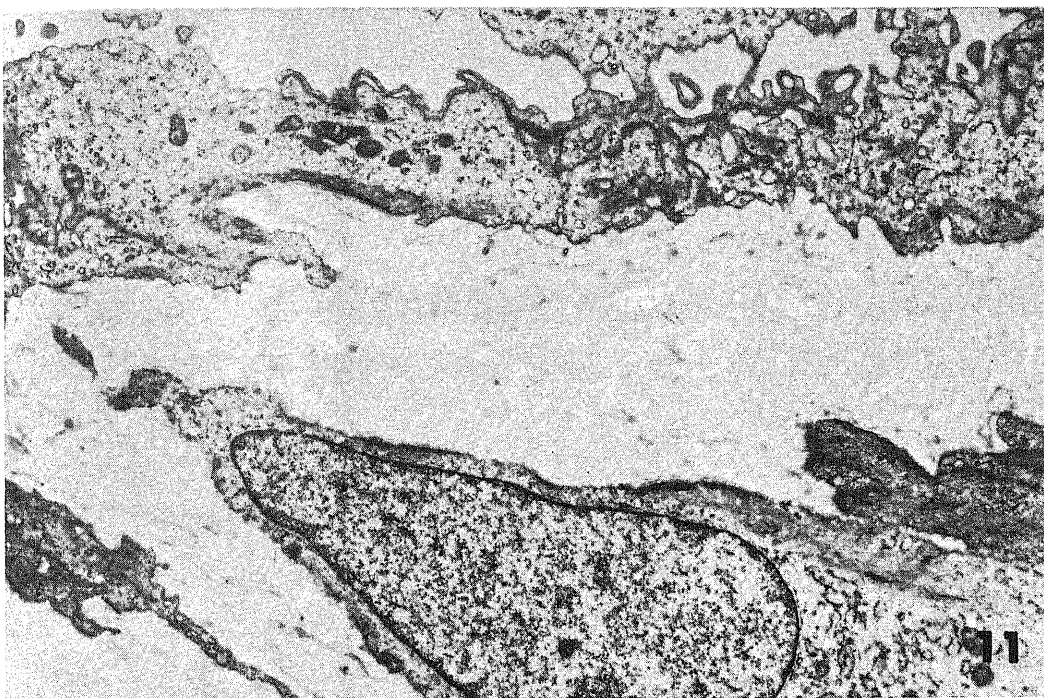


Fig. 11. An electron micrograph showing subendothelial edema which is observed beneath the regenerated endothelial cells. One week after constriction.  $\times 7,800$ .

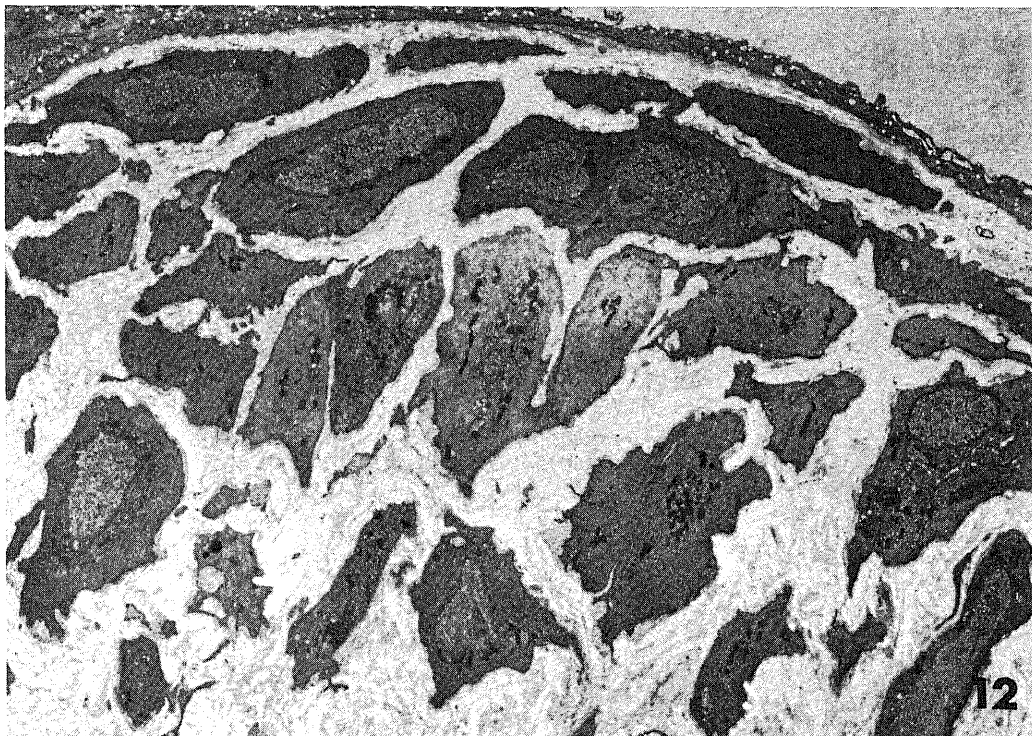


Fig. 12. Fibrous intimal thickening composed of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers. Four weeks after constriction.  $\times 3,400$ .



透過電顕所見：2週目には被包端は一層の扁平な内皮細胞により被覆され、内皮細胞の構造は正常状態に回復する。

内膜における modified smooth muscle cell は減少し、筋原線維の豊富な成熟平滑筋細胞が増加する。4週目には内膜は成熟平滑筋細胞で占められ、細胞間には膠原線維と弾力線維が増加し、線維性肥厚が形成される(図12)。

### III. 内膜の透過性

1. 3日 被包端 4～5 mm の範囲の内膜が Evans ブルーによって青染し、特に被包端から 1 mm の範囲が強染した。内皮欠損部及びその周囲の比較的広い範囲で透過性が亢進していることが示された(図13)。

2. 1週 Evans ブルーに染まる部分は被包端約 1 mm の範囲に減少しており、再生内皮に透過性が亢進していることが示唆された(図14)。

3. 2週 被包端に青染する部分は全く認められず、内皮の透過性が正常に復したことが示された。

表1に以上の被包端に見られた変化を総括する。

## 考 察

### I. 内皮細胞の剝離と再生

本研究において、ウサギ総頸動脈を被包狭窄すると被包後1日で被包端に内皮の剝離が起り、7日後には再生内皮によって完全に再被覆され、その部に一致して内膜の線維性肥厚が発生することが観察された。

内皮の剝離の原因に関しては、これまで高血圧症<sup>18)</sup>、ホモシスチン血症<sup>19)</sup>、高脂血症<sup>5)</sup>、局所の血行力学的変化<sup>3)</sup>、細菌毒素<sup>20)</sup>などが報告されている。本研究では被包端に限局して内皮の剝離が認められたことから、円筒による動脈の被包狭窄のため局所の血行が障害され、その結果内皮細胞の剝離が引き起されたものと推定さ

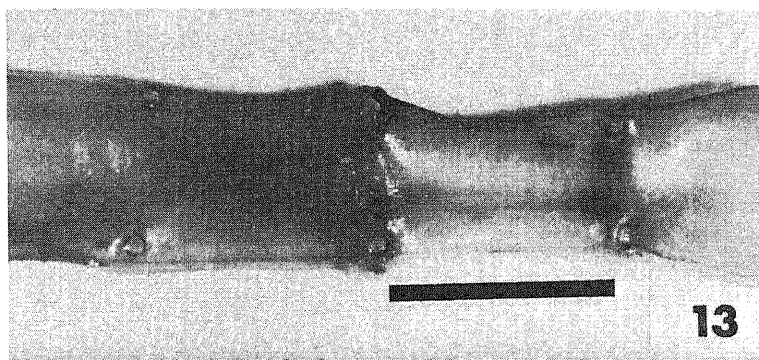


Fig. 13. Gross picture of the luminal surface of the carotid artery dissected immediately after Evans blue injection into the vein in order to check the permeability of the intima on the 3rd day after constriction. Dark stain positive for Evans blue can be seen diffusely at the margins of the cuff (black bar) where the endothelial defect and intimal edema are found.

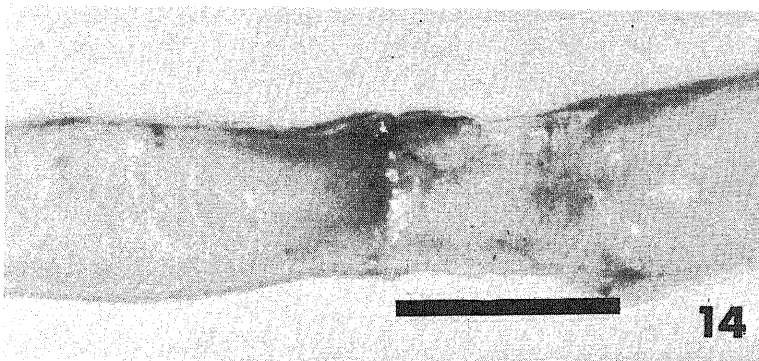


Fig. 14. Luminal aspect of the carotid artery after Evans blue injection on the 7th day after the cuff. Dark stain is still observed adjacent to the distal and proximal margins of the constriction (black bar) in which reendothelialization is completed.

Table 1. Summary of the pathologic findings of the intima in the successive stages of the present experiment at the different areas

		1 d	3 d	7 d	2 w	4 w
Desquamated area	Platelet adhesion	+	+	—	—	—
	Permeability	+	+	+	—	—
	Blood cells	+	+	±	—	—
	Smooth muscle cells	—	+	+	+	+
	Regenerated endothelium	—	+	+	—	—
Marginal area of desquamation	Platelet adhesion	—	—	—	—	—
	Permeability	+	+	—	—	—
	Blood cells	+	+	—	—	—
	Smooth muscle cells	—	+	+	—	—

abbreviations: d, day(s)  
w, weeks  
—, absent or normal  
+, present or increased  
++, abundantly present or markedly increased

れる。

内皮細胞の再生は傷害の大きさや部位、血流、血液の性状によって影響される。又、内皮欠損によって起る平滑筋細胞の増殖の程度によっても左右され、平滑筋細胞の増殖が著しい部位では内皮の再生が遅れることが報告されている<sup>4)21)</sup>。本研究においては内皮の剝離が被包端の小範囲に限局し、内皮の再生は速やかに進行し約7日で内皮の欠損は再生内皮で完全に再被覆された。

内皮細胞の起源については平滑筋細胞<sup>22)</sup>や血液単球<sup>23)</sup>からの転化を推定する人がいるが、多くの研究によって残存内皮細胞の有糸分裂によって内皮が再生されることが証明されている<sup>4)24)~26)</sup>。本研究においても内皮細胞は欠損の辺縁から連続的に増殖することが観察され、単球や、平滑筋細胞が内皮の再被覆に関与することを示す証拠は認められなかった。

本研究で観察された再生内皮細胞の超微構造はこれまで報告された所見と一致する<sup>27)~29)</sup>。その主な特徴として細胞密度の増加、不規則な配列、細胞の重り合い、細胞の腫大、2核細胞、粗面小胞体及びWeibel-Palade顆粒の増加、マイクロフィラメントの集束、基底膜の形成不全などをあげることができる。Weibel-Palade顆粒の増加は再生内皮細胞における注目すべき変化の一つである。Daoudら<sup>30)</sup>及びTrilloら<sup>31)</sup>はコレステロール食飼育動物の大動脈内皮細胞にWeibel-Palade顆粒が増加していることを報告している。この顆粒の機能については明らかではないが、凝固Ⅷ因子の合成に関係があるものと推定されている<sup>31)</sup>。

再生内皮の重要な機能的変化は透過性の亢進である。Evans ブルーの血管内注射によって内皮細胞の再生部位に透過性が亢進していることが明瞭に示された。同様な成績はChristensenら<sup>32)</sup>、Jørgensenら<sup>33)</sup>によっても報告されている。本実験の3日目ではEvans ブルーの弱い着色が再生内皮から離れた部位にも広がっていたが、おそらく器械的ストレスによって一過性に内皮の透過性が亢進した結果であると考えられる<sup>34)</sup>。

血管内皮における物質の透過は形態学的には細胞内の小胞を介する transcytosis と細胞間隙の通過によるものと考えられている<sup>35)~37)</sup>。Gabbianiらは高血圧ラットにおいて内皮細胞のマイクロフィラメントの増加と内皮の透過性亢進とが密接に関連することを観察した<sup>28)</sup>。このフィラメントはアクチンが含まれていることが明らかにされているので<sup>38)39)</sup>、Gabbianiら<sup>28)</sup>は上述の所見から内皮細胞の収縮によって透過性が亢進するものと解釈した。本研究においても再生内皮細胞は立方形を呈し、原形質にしばしばフィラメントの集束が観察され内皮細胞の収縮が内皮の透過性に関与することが示唆される。

## II. 内皮の傷害と内膜肥厚

上述の内皮の再生と共に内膜に平滑筋細胞が次第に増加し、7日後には再生内皮の下に線維性の内膜肥厚が形成された。

内膜に増殖する細胞の大部分は平滑筋細胞であることは多くの研究によって繰返し確められている<sup>1)14)40)</sup>。本研究においても平滑筋細胞が内膜肥厚の主要な細胞成分であることが確認された。内膜水腫の初期に平滑

筋細胞が中膜から内弾性板の有窓から内膜に侵入する像が認められるので、内膜に増加する平滑筋細胞の一部は中膜から遊走した平滑筋細胞と思われる。しかし、内膜に増殖する細胞には  $H^3$ -チミジンの取込みの増加<sup>41)42)</sup>や有糸分裂<sup>43)</sup>が観察されているので、平滑筋細胞は局所で細胞分裂によって増殖することは明らかである。

内膜に浸潤する血液単球<sup>44)</sup>や再生内皮細胞<sup>45)46)</sup>が線維芽細胞又は平滑筋細胞に転化する可能性が指摘されている。本研究では内膜傷害の初期に単球の浸潤が認められたが、その数は少なく、又形態学的に平滑筋細胞へ転化する証拠は認められなかった。再生内皮細胞は時々2層に重り合っているため、その下層の細胞が内膜に落ち込む可能性がある。本研究においても重り合った下層の再生内皮細胞が内膜に落下する像が認められ、ヌクレオシドフォスホリラーゼ活性の存在により内皮細胞が内膜に脱落することが確認された。内膜に脱落した内皮細胞の機能については不明であるが、細胞間マトリックスの一部を産生すると推定されている<sup>14)</sup>。しかし、内膜に脱落した内皮細胞の数は少ないことから、内膜肥厚に大きな役割を果たしていないことは明らかである。

平滑筋細胞の増殖機序に関して注目されるのは Ross 及び協同研究者によって見出された血小板から放出される増殖因子である<sup>47)</sup>。平滑筋細胞の増殖と血小板が密接な関係を有することは、内膜肥厚は血栓形成や血中の血小板数に比例して増強することや培養平滑筋細胞の増殖が血小板の存在下で促進されることによって示された<sup>11)48)49)</sup>。この増殖因子は血小板の顆粒に含まれる分子量 13,000~16,000 の耐熱性蛋白として分離され、培養系において平滑筋細胞や線維芽細胞の DNA 合成を促進することが明らかにされている<sup>50)</sup>。これらの成績から、内皮細胞の剝離によって血小板が凝着し、そこから放出される増殖因子によって平滑筋細胞の増殖が誘発され内膜肥厚が発生するものと説明された<sup>11)</sup>。しかし、一方では実験的動脈硬化症において常に内皮の剝離と血小板の凝着が認められるとは限らず、内膜肥厚の発生に対して血行動態のストレス<sup>51)</sup>や内膜水腫<sup>7)52)~54)</sup>を重視する見解がある。

本研究では内膜肥厚に先立って内皮の剝離と血小板の凝着が認められたが、その期間は短く、内皮の欠損は速やかに再生内皮で被覆されることが観察された。著者の実験系は内皮の欠損が小さいため、血小板の役割を検討するには適当ではないが、平滑筋細胞の増殖は血小板凝着の時期より内皮の再生の時期に強く起ったこと、および内膜肥厚は内皮の再生部分に一致して発生したことなどから、増殖に対しては血小板の凝着

そのものより、内皮の剝離と再生内皮の透過性亢進による内膜傷害が主要な因子として働いているように思われる。内皮の再生領域より離れた部位にも一過性の内膜水腫が見られたが、平滑筋細胞の増殖はほとんど認められず内膜肥厚は発生しなかった。これは内膜傷害が軽度であるためであると解釈される。Haudenschild ら<sup>2)</sup>は平滑筋細胞の増殖は再生内皮で被覆された部位より、内皮の欠損部に強く起ることを報告し、又、Stemerman ら<sup>24)</sup>は内膜肥厚は内皮が完全に再生する以前に頂点に達することを述べている。本研究の結果はこれらの成績と一致しないが、この相異は内皮の欠損の程度によるものと考えられる。内皮の欠損が大きく血小板凝着が強く起る場合には、血小板から遊離する増殖因子が平滑筋細胞の増殖を誘発する主要な因子として働くことは十分ありうることと思われる。しかし、本実験のように内皮の欠損が小さく、血小板の凝着が少ない場合には、内膜水腫のような他の原因によっても平滑筋細胞の増殖が起る可能性があるものと考えられる。

## 結 論

ウサギ総頸動脈を銀板円筒で被包狭窄し、被包端において形成される内膜の線維性肥厚と内皮の変化の関係を電顕的に観察した。

被包後1日で被包端に局限して内皮の剝離と血小板の凝着が起り、内皮の欠損は約7日で再生内皮によって完全に被覆され、その部に一致して内膜の線維性肥厚が発生した。内皮の再生は残存内皮細胞の増殖によって行われ、血液単球や平滑筋細胞による内膜の被覆は認められなかった。

内膜の線維性肥厚は中膜からの平滑筋細胞とそれから産生される細胞間物質で構成されるが、再生内皮から少数の内皮細胞が内膜へ脱落することが観察された。

平滑筋細胞の増殖は内皮の再生と共に進行することから、内膜の線維性肥厚の発生は血漿滲入による内膜傷害と密接な関係があることが示唆された。

## 謝 辞

御指導と御校閲を賜りました恩師梶川欽一郎教授に深謝の意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Stemerman, M. B. & Ross, R.: Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaque formation in

- primates. An electron microscopic study. *J. Exp. Med.*, **136**, 769 - 789 (1972).
- 2) **Haudenschild, C. C. & Schwartz, S. M.**: Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Lab. Invest.*, **41**, 407 - 418 (1979).
- 3) **Stehbens, W. E.**: Haemodynamic production of lipid deposition, intimal tears, mural dissection and thrombosis in the blood vessel wall. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, **185**, 357 - 373 (1974).
- 4) **Fishman, J. A., Ryan, G. B. & Karnovsky, M. J.**: Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab. Invest.*, **32**, 339 - 351 (1975).
- 5) **Ross, R. & Harker, L.**: Hyperlipidemia and atherosclerosis. Chronic hyperlipidemia initiates and maintains lesions by endothelial cell desquamation and lipid accumulation. *Science*, **193**, 1094 - 1100 (1976).
- 6) **Alonso, D. R., Starek, P. K. & Minick, C. R.**: Studies on the pathogenesis of athero-arteriosclerosis induced in rabbit cardiac allografts by the synergy of graft rejection and hypercholesterolemia. *Am. J. Pathol.*, **87**, 415 - 442 (1977).
- 7) 大根田玄寿・吉田洋二・鈴木慶二: 動脈硬化の発生—増殖と滲入—, *動脈硬化*, **1**, 3 - 13 (1973).
- 8) **Ross, R. & Glomset, J. A.**: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Eng. J. Med.*, **295**, 420 - 425 (1976).
- 9) **Thorgeirsson, G. & Robertson, A. L.**: The vascular endothelium—Pathologic significance. *Am. J. Pathol.*, **93**, 803 - 848 (1978).
- 10) **Benditt, E. P. & Gown, A. M.**: Atheroma. The artery wall and the environment. *Internatl. Rev. Exp. Pathol.*, **21**, 56 - 118 (1980).
- 11) **Ross, R., Glomset, J. & Harker, L.**: Response to injury and atherogenesis. *Am. J. Pathol.*, **86**, 675 - 684 (1977).
- 12) **Reidy, M. A. & Schwartz, S. M.**: Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab. Invest.*, **44**, 301 - 308 (1981).
- 13) **Eitel, W., Schmid, G., Schlote, W. & Betz, E.**: Early arteriosclerotic change of the carotid artery wall induced by electrostimulation. A study by scanning and transmission electron microscopy. *Path. Res. Pract.*, **170**, 211 - 229 (1980).
- 14) 勝田省吾: ウサギの実験的動脈硬化症における内膜病変の超微構造的研究. *十全医会誌*, **85**, 154 - 173 (1976).
- 15) **Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.**: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287 - 289 (1975).
- 16) **Luft, J. H.**: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347 - 368 (1971).
- 17) **Borgers, M., Schaper, J. & Schaper, W.**: Nucleoside phosphorylase activity in blood vessels and formed elements of the blood of the dog. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 1041 - 1048 (1972).
- 18) **Still, W. J. S.**: The effect of chronic hypertension on the aortic intima of the rat. *Exp. Mol. Pathol.*, **31**, 1 - 9 (1979).
- 19) **Harker, L. A., Ross, R., Slichter, S. J. & Scott, C. R.**: Homocystine - induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J. Clin. Invest.*, **58**, 731 - 741 (1976).
- 20) **Reidy, M. A. & Bowyer, D. E.**: Scanning electron microscopy morphology of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Atherosclerosis*, **26**, 319 - 328 (1977).
- 21) **Schwartz, S. M., Stemerman, M. B. & Benditt, E. P.**: The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. *Am. J. Pathol.*, **81**, 15 - 42 (1975).
- 22) **Spaet, T. H., Stemerman, M. B. & Lejniek, I.**: The role of smooth muscle cells in repopulation of rabbit aortic endothelium, following balloon injury. *Fed. Proc.*, **32**, 219Abs. (1973).
- 23) **Baumgartner, J. R. & Spaet, H. T.**: Endothelial replacement in rabbit arteries. *Fed. Proc.*, **29**, 710Abs. (1970).
- 24) **Stemerman, M. B., Spaet, T. H., Pitlick, J., Cintron, J., Lejnieks, I. & Tiell, M. L.**: Intimal healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Am. J. Pathol.*, **87**, 125 - 142 (1977).
- 25) **Ausprunk, D. H. & Folkman, J.**: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor



- angiogenesis. *Microvasc. Res.*, **14**, 53 - 65 (1977).
- 26) **Harker, L. A., Ross, R. & Glomset, J.:** Atherogenesis. Endothelial injury and platelet-mediated intimal smooth muscle cell proliferation, p89 - 102. In G. deGaetano & S. Garattini (ed.), *Platelet: A multidisciplinary approach*, Raven Press, New York, 1978.
- 27) **Webster, W. S., Bishop, S. P. & Geer, J. C.:** Experimental aortic intimal plaques. *Am. J. Pathol.*, **70**, 37Abs. (1973).
- 28) **Gabbiani, G., Elemer, G., Guelpa, Ch., Vallotton, M. B., Badonnel, M. C. & Huttner, I.:** Morphologic and functional changes of the aortic intima during experimental hypertension. *Am. J. Pathol.*, **96**, 399 - 422 (1979).
- 29) **Todd, M. E. & Friedman, S. M.:** The ultrastructure of peripheral arteries during the development of DOCA hypertension in the rat. *Z. Zellforsch.*, **128**, 538 - 554 (1972).
- 30) **Daoud, A. S., Jones, R. & Scott, R. F.:** Dietary induced atherosclerosis in miniature swine. II. Electron microscopy observations: Characteristics of endothelial and smooth muscle cells in the proliferative lesion and elsewhere in the aorta. *Exp. Mol. Pathol.*, **8**, 263 - 301 (1968).
- 31) **Trillo, A. A. & Prichard R. W.:** Early endothelial changes in experimental primate atherosclerosis. *Lab. Invest.*, **41**, 294 - 302 (1979).
- 32) **Christensen, B. C., Chemnitz, J., Tkocz, I. & Kim, C. M.:** Repair in arterial tissue. I. Endothelial regrowth, subendothelial tissue changes and permeability in the healing rabbit thoracic aorta. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.*, **87**, 265 - 273 (1979).
- 33) **Jørgensen, L., Packham, M. A., Rowsell, H. C. & Mustard, J. F.:** Deposition of formed elements of blood on the intima and signs of intimal injury in the aorta of rabbit, pig. and man. *Lab. Invest.*, **27**, 341 - 350 (1972).
- 34) **Fry, D. L.:** Responses of the arterial wall to certain physical factors, p93 - 125. In *Atherogenesis: Initiating factors*, Ciba symposium No. 22, Amsterdam, North Holland, 1973.
- 35) **Stein, O. & Stein, Y.:** An electron microscopic study of the transport of peroxidases in the endothelium of mouse aorta. *Z. Zellforsch.*, **133**, 211 - 222 (1972).
- 36) **Schwartz, S. M. & Benditt, E. P.:** Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic intima. *Am. J. Pathol.*, **66**, 241 - 255 (1972).
- 37) **Hüttner, I., Boutet, M. & More, R. H.:** Studies on protein passage through arterial endothelium. I. Structural correlates of permeability in rat arterial endothelium. *Lab. Invest.*, **28**, 672 - 677 (1973).
- 38) **Yohro, Y. & Burnstock, G.:** Filament bundles and contractility of endothelial cells in coronary arteries. *Z. Zellforsch.*, **138**, 85 - 95 (1973).
- 39) **Haudenschield, C. C., Cotran, R. S., Gimb-rone, M. A. Jr. & Folkman, J.:** Fine structure of vascular endothelium in culture. *J. Ultrastruct. Res.*, **50**, 22 - 32 (1975).
- 40) **Suzuki, M., Fukuchi, Y., Shimazu, K., Kim, H. S. & Meyer, J. S.:** Cerebral atherosclerosis in the dog. II. Cerebral circulation. *Arch. Pathol.*, **96**, 14 - 17 (1973).
- 41) **Hassler, O.:** Cell renewal in aortic necrosis following orthostatic collapse: An experimental autoradiographic study in the rabbit using  $H^3$ -thymidine. *Virchows Arch. A Path. Anat. Histol.*, **358**, 295 - 299 (1973).
- 42) **Fernandez, D. & Crane, W. A. J.:** New cell formation in rats with accelerated hypertension due to partial aortic constriction. *J. Pathol.*, **100**, 307 - 316 (1970).
- 43) **Imai, H., Lee, K. J., Lee, S. K., Lee, K. T., O' Neal, R. M. & Thomas, W. A.:** Ultrastructural features of aortic cells in mitosis in control cholesterol-fed swine. *Lab. Invest.*, **23**, 401 - 415 (1970).
- 44) **Still, W. J. S.:** The early effect of hypertension on the aortic intima of the rat. *Am. J. Pathol.*, **51**, 721 - 734 (1967).
- 45) **須永俊明:** 内皮細胞傷害時に内皮細胞直下に出現する変性細胞の研究—その起源と内皮組織の変化との関係. *脈管学*, **15**, 277 - 292 (1975).
- 46) **Suzuki, K., Hori, S. & Ooneda, G.:** Derivation of intimal cells appearing in spontaneous healing process of hypertensive arterial lesions. *Exp. Mol. Pathol.*, **23**, 402 - 416 (1975).
- 47) **Ross, R., Glomset, J. A., Kariya, B. & Harker, L.:** A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

71, 1207 - 1210 (1974).

48) Davis, P. F. & Ross, R.: Mediation of pinocytosis in cultured arterial smooth muscle and endothelial cells by platelet derived growth factor. *J. Cell Biol.*, **73**, 663 - 671 (1978).

49) Ross, R.: Endothelial integrity, cell proliferation, and atherosclerosis, p51 - 60. In R. M. Laner & R. B. Shekelle (ed.), *Childhood prevention of atherosclerosis and hypertension*, Raven Press, New York, 1980.

50) Antoniades, H. N., Scher, C. D. & Stiles, C. D.: Purification of the human platelet - derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1809 - 1813 (1979).

51) Stehberns, W. E. & Ludatscher, R. M.: Ultrastructure of the renal arterial bifurcation of rabbits. *Exp. Mol. Pathol.*, **18**, 50 - 67 (1973).

52) 吉田洋二: 動脈硬化の病理—特に初期変化—. *Geriatric Medicine*, **13**, 213 - 219 (1973).

53) Daoud, A. S., Fritz, K. E., Jarmolych, J. & Augustyn, J. M.: Use of aortic medial explants in the study of arteriosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.*, **18**, 177 - 189 (1973).

54) 島本多喜雄: 動脈内皮細胞の収縮嚥下活動のカーボン法による分析と cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors によるその抑制. *動脈硬化*, **1**, 215 - 231 (1974).

**An Electron Microscopic Study on the Early Change of Intimal Thickening in Arteriosclerosis**  
Tokuji Kitamura, Department of Pathology (I) (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., **91**, 876 - 889 (1982)

**Key words:** Fibrous intimal thickening, Regenerating endothelium.

#### Abstract

Electron microscopic studies were made of the interaction of endothelial changes to the formation of intimal fibrous plaques induced by constricting the common carotid artery of rabbits with a silver cuff. One day after constriction the endothelial cells were detached from the arterial surface in the margins of cuffing and platelets accumulated in the denuded areas. Within 7 days re-endothelialization was accomplished by proliferation of endothelial cells from the surrounding endothelium. Just beneath the regenerated endothelium the intimal plaque was produced by proliferation of arterial smooth muscle cells from the media in association with formation of new extra cellular matrix, including collagen, elastin and proteoglycans. Although some of endothelial cells were found to migrate into the intima, there was no evidence that these cells were involved in the fibrous plaque formation. It was suggested that increased permeability in the regenerating endothelium promoted migration and proliferation of medial smooth muscle cells.